

Manual do kit *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Versão 1

IVD

Para utilização de diagnóstico *in vitro*



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2 **MAT** 1075556PT



Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Índice

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	7
Controlos	8
Materiais fornecidos	9
Conteúdo do kit	9
Materiais necessários mas não fornecidos	10
Advertências e precauções	13
Informações de segurança	13
Precauções gerais	13
Armazenamento e manuseamento de reagentes	14
Armazenamento e manuseamento de amostras	14
Procedimento	15
Isolamento de ADN	15
Protocolos	
■ 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24	16
■ 2: PCR utilizando os reagentes de PCR fornecidos com o kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	19
■ 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho	22
■ 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24	24
■ 5: Execução do sistema PyroMark Q24	29
■ 6: Análise de uma execução PyroMark Q24	32
Interpretação de resultados	36
Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível	36
Guia de resolução de problemas	40
Controlo de qualidade	43
Limitações	43

Características de desempenho	43
Limite do branco e limite de detecção	43
Linearidade	45
Precisão	46
Avaliação de diagnóstico	48
Bibliografia	49
Símbolos	50
Informações de contacto	51
Anexo A: Preparação de ensaios <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	52
Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos	56
Informações para encomendar	58

Utilização prevista

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro é um teste de detecção *in vitro* de ácido nucleico com base em sequências, baseado na tecnologia Pyrosequencing®, para a detecção quantitativa de mutações nos exões 9 do gene humano *KIT* e no exão 18 do gene humano *PDGFRA*, no ADN genómico derivado de amostras de tecido humano.

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro destina-se a fornecer aos médicos informações para ajudar na gestão de doentes diagnosticados com tumor estromal gastrointestinal (GIST) com maior probabilidade de beneficiar de medicamentos que visem as vias de sinalização, tais como o imatinib. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Apenas para utilização no sistema PyroMark® Q24. Os sistemas PyroMark Q24 incluem o seguinte:

- O equipamento PyroMark Q24 e o equipamento PyroMark Q24 MDx.
- A estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 MDx.
- O software de PyroMark Q24 (versão 2.0) e o software de PyroMark Q24 MDx (versão 2.0).

O produto deve ser utilizado por utilizadores profissionais, como técnicos e médicos especializados em procedimentos de diagnóstico *in vitro*, em técnicas de biologia molecular e no sistema PyroMark Q24.

Este produto não se destina à utilização de amostras de tecido pulmonar.

Resumo e explicação

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro é utilizado para as medições quantitativas das mutações no exão 9 do gene *KIT* e no exão 18 do gene *PDGFRA* (ver Imagem 1). A detecção de mutações no exão 9 do gene *KIT* permite a utilização da dose adequada de imatinib e a detecção de mutações no exão 18 do gene *PDGFRA* ajuda a excluir genótipos menos sensíveis ou resistentes (1–3).

<i>KIT</i> exão 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
<i>PDGFRA</i> exão 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Imagem 1. Contexto genómico das regiões sequenciadas dos genes humanos *KIT* e *PDGFRA* (Ensembl IDs ENSG00000157404 e ENSG00000134853). O códão 503 do gene *KIT* e o códão 842 do gene *PDGFRA* são indicados por quadrados.

O kit consiste em dois ensaios: um para detecção de mutações no exão 9 do gene *KIT* e outro para detecção de mutações no exão 18 do gene *PDGFRA* (ver Imagem 2). As duas regiões são amplificadas em separado por PCR e sequenciadas pela região definida. As sequências em redor das posições definidas servem como picos de normalização e de referência para a quantificação e avaliação da qualidade da análise.

Nota: Ambos os ensaios são sequenciados na direcção em frente.

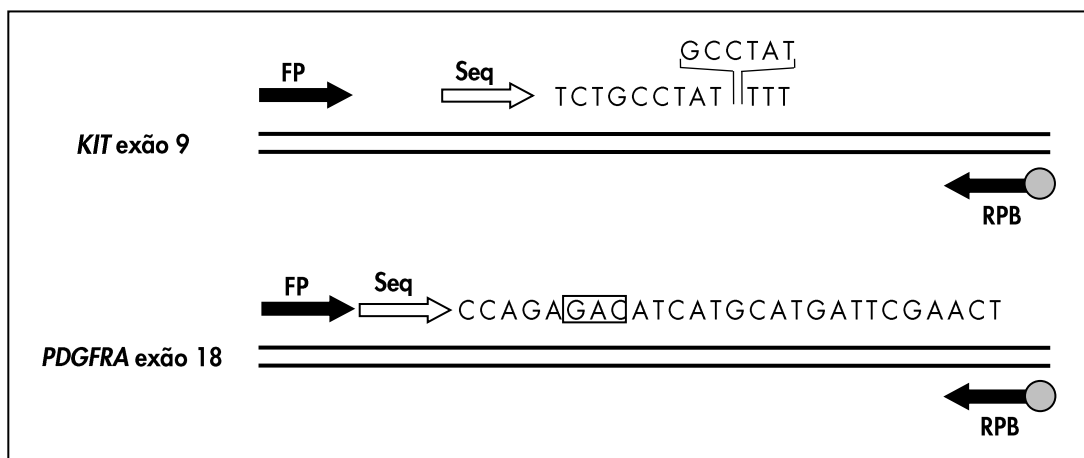


Imagem 2. Ilustrações dos ensaios do gene *KIT*/*PDGFRA*. A sequência indicada é a sequência analisada para uma amostra *wild type*. É indicada a posição e sequência da duplicação do par de bases 6 no exão 9 do gene *KIT*. O quadrado indica o códão 842 do exão 18 do gene *PDGFRA*. **FP:** Iniciadores de PCR para a frente; **RPB:** Iniciadores PCR de inversão (B indica biotilação); **Seq:** Iniciadores de sequenciação.

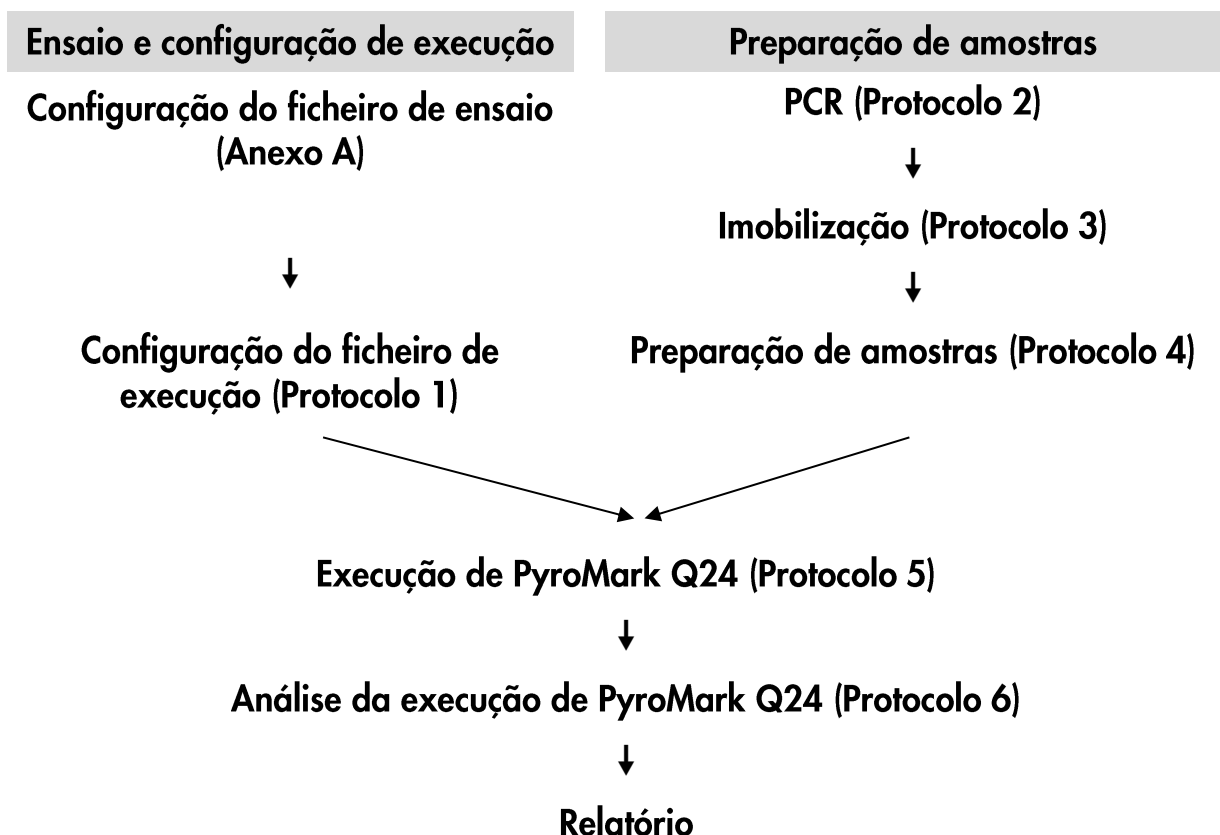
O produto consiste numa mistura de iniciadores de PCR e num iniciador de sequenciação para cada ensaio. Os iniciadores são fornecidos em solução. Cada frasco contém 32 µl de cada iniciador ou mistura de iniciadores.

Princípio do procedimento

O fluxo de trabalho a seguir ilustra o procedimento de ensaio. Depois de a PCR usar iniciadores que visam o exão 9 do gene *KIT* e o exão 18 do gene *PDGFRA*, os amplicons são imobilizados em bandas de Streptavidin Sepharose® High Performance. O ADN de cadeia simples é preparado e os respectivos de iniciadores de sequenciação são hibridizados para o ADN. Em seguida, as amostras são analisadas no PyroMark Q24, usando ficheiros de configuração do ensaio e um ficheiro de execução.

Recomenda-se a utilização do GIST RapidScreen Plug-in Report para analisar a execução. O GIST RapidScreen Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com. Contudo, a execução também pode ser analisada utilizando a ferramenta de análise que faz parte integrante do sistema PyroMark Q24. A "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) pode ser ajustada para a detecção de mutações raras após a execução (consultar "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", página 32, e "Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", página 52).

Fluxo de trabalho do procedimento de *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Controlos

O ADN de controlo não metilado está incluído no kit como um controlo positivo da PCR e reacções de sequenciação. Este ADN de controlo tem um genótipo wild type nas regiões sequenciadas utilizando este kit e é necessário para a interpretação adequada dos resultados e a identificação de mutações de nível baixo (consultar "Interpretação de resultados", página 32). Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação.

Além disso, deve ser incluído um controlo negativo (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

Kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (caixa 1/2)

Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro (24)	(24)
Ref.^o	971510
Número de reacções	24
Seq Primer KIT exon 9 (Iniciador de Seq de KIT exão 9)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Iniciador de Seq de PDGFRA exão 18)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (Mistura de iniciadores de KIT exão 9)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (Mistura de iniciadores de PDGFRA exão 18)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (Mistura principal de PCR PyroMark, 2x)	850 µl
CoralLoad [®] Concentrate, 10x (Concentrado CoralLoad [®] , 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (ADN de controlo não metilado, 10 ng/µl)	100 µl

Soluções tampão e reagentes Pyro *therascreen* (caixa 2/2)

Soluções tampão e reagentes <i>therascreen</i> Pyro	
PyroMark Binding Buffer (Tampão de ligação PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampão de "annealing" PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Solução de desnaturação PyroMark)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (Tampão de lavagem PyroMark, 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Mistura de enzimas)	1 frasco
Substrate Mixture (Mistura de substrato)	1 frasco
dATP α S	1 180 μ l
dCTP	1 180 μ l
dGTP	1 180 μ l
dTTP	1 180 μ l
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (Manual do kit <i>therascreen GIST RapidScreen Pyro</i>) (inglês)	1

* Contém hidróxido de sódio.

Materiais necessários mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

Reagentes

- Kit de isolamento de ADN (consulte "Isolamento de ADN", na página 15)
- Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare, ref.º 17-5113-01; www.gelifesciences.com)

- Água de grande pureza (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou equivalente)
Nota: É fornecida água suficiente no kit para a PCR, a imobilização de ADN e para dissolver a mistura de enzimas e a mistura de substrato; é necessária água adicional de grande pureza para diluir o tampão de lavagem PyroMark, 10x
- Etanol (70%)*

Consumíveis

- Pontas de pipeta esterilizadas (com filtros para configuração de PCR)
- Placa de PCR de 24 poços (consultar "Placas de 24 poços recomendadas", página 12)
- Folha adesiva

Equipamento

- Pipetas (ajustáveis)[†]
- Microcentrifugadora de bancada[†]
- Termociclador[†] e tubos de PCR adequados
- PyroMark Q24 (Ref.º 9001513 ou 9001514)^{†‡}
- Software de PyroMark Q24 (ref.º 9019063 ou 9019062)[‡]
- Placa PyroMark Q24 (ref.º 979201)[‡]
- Cartucho de PyroMark Q24 (ref.º 979202)[‡]
- Estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 (ref.º 9001515 ou 9001517)^{†‡}
- Misturador e placa[†] para a imobilização de bandas (consulte "Misturadores de placas recomendados", página 12)
- Bloco de aquecimento[†] capaz de atingir os 80 °C

* Não utilizar álcool desnaturado, que contém outras substâncias como o metanol ou a metil-etil-cetona.

[†] Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

[‡] Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE. Todos os outros produtos apresentados não têm o símbolo CE-IVD, com base na directiva europeia 98/79/CE.

Placas de 24 poços recomendadas

As placas de 24 poços indicadas no Quadro 1 são recomendadas para utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Quadro 1. Placas de 24 poços recomendadas para utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Misturadores de placas recomendados

Os misturadores orbitais de placas indicados no Quadro 2 são recomendados para utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Quadro 2. Misturadores de placas recomendados para utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Fabricante	Produto	Ref. ^o
	Thermomixer comfort (dispositivo básico)	5355 000.011
Eppendorf	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Advertências e precauções

Para utilização de diagnóstico *in vitro*

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as MSDS de cada kit QIAGEN® e componente do kit.

As seguintes advertências de perigo e frasesprecautionary aplica-se a componentes do kit theascreen GIST Rapid Screen Pyro:

PyroMark Denaturation Solution



Atenção! Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode ser corrosivo para os metais. Absorver o produto derramado a fim de evitar danos materiais. Conservar unicamente no recipiente de origem. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

Precauções gerais

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- É necessário o cumprimento estrito do manual de utilizador para a obtenção de resultados optimizados. Não se recomenda a diluição de reagentes não descritos neste manual; a sua utilização pode resultar numa redução do seu desempenho.
- Os componentes deste produto são suficientes para executar 24 reacções em até 5 execuções independentes.
- Utilize pontas de pipeta esterilizadas (com filtros para configuração da PCR).
- Armazene e extraia materiais positivos (amostras, controlos positivos e amplicons) separadamente de todos os reagentes restantes e adicione-os à mistura de reacção numa instalação em separado.

- Descongele completamente todos os componentes à temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar um ensaio.
- Quando estiver descongelado, misture os componentes (pipetando repetidamente para cima e para baixo ou agitando em vortex) e centrifugue com brevidade.
- Resultados falhados não são uma base para uma decisão de estado de mutação.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro é transportado em duas caixas. O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (caixa 1/2) é transportado em gelo seco. A mistura principal de PCR PyroMark, o concentrado CoralLoad, o ADN de controlo não metilado e todos os iniciadores devem ser armazenados entre -15 e -30 °C, logo após a chegada.

As soluções tampão e os reagentes *therascreen* Pyro (caixa 2/2) que contêm soluções tampão, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP e dTTP (os reagentes para análise de piro-sequenciação) são transportados em embalagens refrigeradas. Estes componentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C, logo após a chegada. Para minimizar a perda de actividade, é aconselhável manter a mistura de enzimas e a mistura de substrato nos frascos fornecidos.

As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas permanecem estáveis durante, pelo menos, 10 dias entre 2 e 8 °C. As misturas de enzimas e de substrato reconstituídas podem ser congeladas e armazenadas nos seus frascos entre -15 e -30 °C. Os reagentes congelados não devem ser sujeitos a mais de 6 ciclos de congelamento/descongelamento.

Nota: Os nucleótidos não devem ser congelados.

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro mantém-se estável até à data de prazo de validade do kit, quando armazenado nestas condições.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso.

O material das amostras é ADN humano extraído do sangue ou de amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE).

Não se deve utilizar amostras humanas submetidas a tratamento de heparina. Não se deve utilizar as amostras de sangue que tenham sido recolhidas em tubos que continham heparina como anticoagulante. A heparina afecta a PCR.

Procedimento

Isolamento de ADN

O desempenho do sistema foi estabelecido através do kit EZ1[®] DNA Tissue e do kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue para a extracção de ADN humano de amostras de tumor fixadas em formalina e conservadas em parafina. No sistema de kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, o desempenho foi estabelecido através de amostras de sangue de dador saudável, perfurada parcialmente com células de tumor.

Os kits da QIAGEN apresentados no quadro 3 são válidos para a purificação de ADN dos tipos de amostras humanas indicadas para a utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Efectuar a purificação de ADN de acordo com as instruções dos manuais do kits.

Quadro 3. Kits de purificação de ADN recomendados para utilização com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Material de amostra	Kit de isolamento do ácido nucleico	Ref. ^o (QIAGEN)
Tecido conservado em parafina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	Kit EZ1 DNA Tissue (48)*	953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

*Siga o protocolo para a utilização de tecido conservado em parafina. O kit EZ1 DNA Tissue deve ser utilizado em conjunto com o EZ1 Advanced (ref.^o 9001410 ou 9001411) e o cartão EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018298), com o EZ1 Advanced XL (ref.^o 9001492) e o cartão EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9018700), ou com o BioRobot[®] EZ1 (ref.^o 9000705; já não está disponível) e o cartão EZ1 DNA Paraffin Section Card (ref.^o 9015862).

[†] Com símbolo CE-IVD, conforme a directiva europeia 98/79/CE.

Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24


Aspecto importante antes do início do procedimento

- Se necessário, o LOB pode ser confirmado utilizando uma amostra *wild type* para gerar uma placa inteira de resultados. Para mais informações, consulte a directriz EP17-A do CLSI "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline" (Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada).

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Se o GIST RapidScreen Plug-in Report não tiver sido instalado, crie uma configuração de ensaio (consultar "Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", na página 52). Isto tem de ser feito apenas uma vez, antes de executar os ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro pela primeira vez. No caso de o GIST RapidScreen Plug-in Report estar instalado, estão disponíveis configurações de ensaio predefinidas no browser de atalhos do software PyroMark Q24, no caminho "Example Files/PyroMark Setups/GIST". O GIST RapidScreen Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com.

Procedimento

1. **Clique em  na barra de ferramentas.**
É criada uma nova execução.
2. **Introduza os parâmetros de execução (consulte "Parâmetros de execução", página 17).**
3. **Configure a placa, adicionando ensaios tanto para o exão 9 do gene KIT como para o exão 18 do gene PDGFRA aos poços que correspondem às amostras a analisar.**
Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.
Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação ("Controlos", página 8).
4. **Quando a execução está configurada e pronta a executar no sistema PyroMark Q24, imprima uma lista dos volumes necessários de mistura de enzimas, mistura de substrato e nucleótidos e a configuração da placa.**

Selecione "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) do menu "Tools" (Ferramentas) e, quando o relatório aparece, clique em .

5. Feche o ficheiro de execução e copie-o para um dispositivo de armazenamento de dados USB (fornecido com o sistema), utilizando o Windows® Explorer.

As informações de pré-execução impressas podem ser utilizadas como modelo para a configuração de amostras (consulte "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho", na página 22).

Para executar a placa no PyroMark Q24, consultar "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", página 29.

Parâmetros de execução

"Run name" (Nome de execução):	O nome da execução é atribuído quando o ficheiro é guardado. Ao mudar o nome do ficheiro também altera o nome da execução.
"Instrument method" (Método do equipamento):	Selecione o método do equipamento, de acordo com o cartucho que será utilizado na execução; consultar as instruções fornecidas com os produtos.
"Plate ID" (ID da placa):	Opcional: Introduza a ID da placa PyroMark Q24.
"Bar code" (Código de barras):	Opcional: Introduza o número de código de barras da placa ou, se tiver um leitor de códigos de barras ligado ao seu computador, coloque o cursor do rato na caixa de texto "Barcode" (Código de barras) (clitando na caixa) e faça a leitura do código de barras.
"Kit and Reagent ID" (ID de reagente e de kit):	Opcional: Introduza o número de lote caixa 1 e caixa 2 do kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro a usar. Pode encontrar o número de lote na etiqueta do produto. Nota: Recomenda-se a introdução de ambos os números de lote para que seja possível detectar quaisquer problemas inesperados com o kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
Nota de execução:	Opcional: Introduza uma nota sobre os conteúdos ou objectivo da execução.

Adicionar ficheiros de ensaio

Para adicionar um ensaio a um poço, pode:

- Clicar com o botão direito do rato no poço e seleccionar "Load Assay" (Carregar ensaio) no menu de contexto.
- Seleccionar o ensaio no browser de atalhos, clicar e arrastar o ensaio para o poço.

Um poço é codificado com uma cor, de acordo com o ensaio carregado no poço.

Introdução de ID's de amostras e de notas

Para introduzir uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula e introduza o texto.

Para editar uma ID de amostra ou nota, seleccione a célula (os conteúdos actuais serão seleccionados) ou faça duplo clique na célula.

Protocolo 2: PCR utilizando os reagentes de PCR fornecidos com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Este protocolo serve para amplificações de PCR de uma região que contém o exão 9 do gene *KIT* e uma amplificação de PCR em separado de uma região que contém o exão 18 do gene *PDGFRA*, usando o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- A polimerase HotStarTaq® de ADN na mistura principal de PCR PyroMark necessita de um passo de activação de **15 minutos a 95 °C**.
- Prepare todas as misturas de reacção numa área diferente da utilizada para a purificação de ADN, adicionando o modelo à PCR, à análise do produto de PCR ou à preparação de amostras antes da análise de pirosequenciação.
- Utilize pontas descartáveis que contêm filtros hidrofóbicos para minimizar a contaminação cruzada.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de PCR, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Ajuste a concentração do controlo e do ADN de amostra, se necessário, para 0,4–2 ng/μl.

Procedimento

- 1. Descongele todos os componentes necessários (consultar o Quadro 4).**
Misture bem antes da utilização.
- 2. Prepare uma mistura de reacção para cada iniciador de PCR, definida de acordo com o Quadro 4.**

Geralmente, a mistura de reacção contém todos os componentes necessários para a PCR, excepto a amostra.

Prepare um volume de mistura de reacção superior ao necessário para o número total de ensaios de PCR a efectuar.

Quadro 4. Preparação de mistura de reacção para cada mistura de iniciadores de PCR

Componente	Volume/reacção
Mistura principal de PCR PyroMark, 2x	12,5 µl
Concentrado CoralLoad, 10x	2,5 µl
Iniciador de PCR KIT exão 9 ou iniciador de PCR PDGFRA exão 18	1 µl
Água (H ₂ O, fornecida)	4 µl
Volume total	20 µl

3. Misture cuidadosamente a mistura de reacção e distribua 20 µl em cada tubo de PCR.

Não é necessário manter os tubos de PCR no gelo, desde que a polimerase HotStarTaq de ADN esteja inactiva à temperatura ambiente.

4. Adicione 5 µl de modelo de ADN (2–10 ng de ADN genómico) aos tubos de PCR individuais (consultar o quadro 5) e misture cuidadosamente.

Nota: Deve ser incluída uma amostra de controlo negativa (sem modelo de ADN) em cada configuração de PCR para pelo menos um ensaio.

Nota: Incluir uma amostra com ADN de controlo não metilado para cada ensaio de cada execução de piro-sequenciação (consultar "Controlos", na página 8).

Quadro 5. Preparação de PCR

Componente	Volume/reacção
Mistura de reacção	20 µl
ADN da amostra	5 µl
Volume total	25 µl

5. Programe o termociclador de acordo com as instruções do fabricante, utilizando as condições descritas no Quadro 6.

Quadro 6. Protocolo de ciclagem otimizada

			Comentários
Passo de activação inicial:	15 minutos	95 °C	A polimerase HotStarTaq de ADN é activada por este passo de aquecimento.
Ciclagem de 3 passos:			
Desnaturação	20 segundos	95 °C	
Annealing	30 segundos	53 °C	
Extensão	20 segundos	72 °C	
Número de ciclos	42		
Extensão final:	5 minutos	72 °C	

6. Coloque os tubos de PCR no termociclador e inicie o programa de ciclagem.
7. Após a amplificação, continue com "Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho", na página 22.

As amostras de PCR podem ser armazenadas a temperatura entre 2 e 8 °C durante até 3 dias.

Protocolo 3: Imobilização de produtos de PCR em bandas de sefarose-estreptavidina de alto desempenho

Este protocolo destina-se à imobilização do modelo de ADN em Estreptavidina Sepharose High Performance (GE Healthcare) antes da análise no sistema PyroMark Q24.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Deixar que todos os reagentes e soluções necessários atinjam a temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes de iniciar.
- Ligue o PyroMark Q24 pelo menos 30 minutos antes de iniciar uma execução. O interruptor está situado na parte traseira do equipamento.
- Coloque um suporte da placa PyroMark Q24 num bloco de aquecimento pré-aquecido a 80 °C. Deixe um segundo suporte da placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- O tampão de lavagem PyroMark é fornecido como um concentrado 10x. Antes da primeira utilização, dilua para uma solução de trabalho de 1x, adicionando 225 ml de água de grande pureza a 25 ml de tampão de lavagem PyroMark 10x (volume final de 250 ml).

Nota: A solução de trabalho de 1x tampão de lavagem PyroMark mantém-se estável entre 2 e 8 °C até ao prazo de validade indicado.

- Prepare a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 para a preparação de amostras como descrito no Manual de Utilizador do PyroMark Q24.

Procedimento

- 1. Agite cuidadosamente o frasco que contém Estreptavidina Sepharose High Performance até se tornar numa solução homogénea.**
- 2. Prepare uma mistura principal para a imobilização de ADN, de acordo com o Quadro 7.**

Prepare um volume superior ao necessário para o número total de reacções a ser desempenhadas (número de reacções + um adicional).

Quadro 7. Mistura principal para a imobilização de ADN

Componente	Volume/amostra
Tampão de ligação PyroMark	40 µl
Estreptavidina Sepharose High Performance	1 µl
Água (H ₂ O, fornecida)	29 µl
Volume total	70 µl

Nota: Este protocolo aplica-se à Estreptavidina Sepharose High Performance com número de lote 10057037 ou superior. Quando utilizar bandas de Estreptavidina Sepharose High Performance com número de lote inferior a 10057037, o volume utilizado de bandas por amostra deve ser aumentado para 2 µl, ao mesmo tempo que reduz adequadamente o volume de água.

- 3. Adicione 70 µl da mistura principal aos poços de uma placa de PCR de 24 poços conforme predefinido na configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 16).**

As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. Assegure a homogeneidade da mistura principal, misturando frequentemente usando uma pipeta ou agitando em vortex. Não vire a mistura principal para baixo.

- 4. Adicione 10 µl de produto de PCR biotilado do protocolo 2 a cada poço que contém mistura principal, conforme predefinido na configuração da execução (consulte "Protocolo 2: PCR utilizando os reagentes de PCR fornecidos com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", na página 19).**

O volume total por poço deve ser 80 µl após a adição da mistura principal e do produto de PCR.

- 5. Sele a placa de PCR com folha adesiva.**

Certifique-se de que não são possíveis fugas entre os poços.

- 6. Agite a placa de PCR à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos, a 1400 rpm.**

Durante este processo, prossiga imediatamente com "Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24", página 24.

Protocolo 4: Preparação de amostras antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24

Este protocolo serve para a preparação de ADN de cadeia simples e para "annealing" do iniciador de sequenciação para o modelo antes da análise de piro-sequenciação no PyroMark Q24.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Antes de abrir os tubos com iniciadores de sequenciação, centrifugue com brevidade para assegurar a concentração dos conteúdos no fundo dos tubos.
- Adicione os 2 iniciadores de sequenciação diferentes no mesmo padrão, como predefinido para a placa na configuração da execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", página 16), dependendo da região da análise (exão 9 do gene *KIT* ou exão 18 do gene *PDGFRA*).
- Não reduza o tempo para arrefecer as amostras depois do aquecimento para 80 °C.
- Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no *PyroMark Q24 User Manual* (Manual do Utilizador do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.

Procedimento

- 1. Dilua uma quantidade suficiente de cada iniciador de sequenciação, iniciador de Seq KIT exão 9 e iniciador de Seq PDGFRA exão 18, em tampão de "Annealing" PyroMark, como descrito na Quadro 8.**

Prepare um volume de iniciador de sequenciação diluído superior ao necessário para o número total de amostras a ser sequenciadas (número de amostras + um adicional).

Não dilua e armazene mais iniciador de sequenciação.

Quadro 8. Exemplo de diluição dos iniciadores de sequenciação

Componente	Volume/amostra	Volume para reacções 9 + 1
Tampão de "annealing" PyroMark	24,2 µl	242 µl
Iniciador de Seq de KIT exão 9 ou Iniciador de Seq de PDGFRA exão 18	0,8 µl	8 µl
Volume total	25 µl	250 µl

- 2. Adicione 25 µl do iniciador de sequenciação diluído a cada poço da placa PyroMark Q24, de acordo com a configuração de execução (consulte "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 16).**

Mantenha um dos suportes de placa PyroMark Q24 (fornecidos com a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24) à temperatura ambiente (15 a 25 °C), e utilize-o como apoio durante a preparação e movimentação da placa.

- 3. Ligue a bomba de vácuo da estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24.**
- 4. Coloque a placa de PCR do protocolo 3 e a placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo (Imagem 3).**

Inspeccione a placa PCR e certifique-se de que as bandas Sepharose estão na solução. Certifique-se de que a placa de PCR tem a mesma orientação que tinha quando as amostras foram carregadas.



Imagem 3. Colocação da placa de PCR e da placa PyroMark Q24 na estação de trabalho de vácuo.

5. Aplique vácuo à ferramenta, ao abrir o comutador de vácuo.
6. Baixe lentamente as sondas de filtro da ferramenta de vácuo na direcção da placa de PCR para captar as bandas que contêm modelo imobilizado. Mantenha as sondas no lugar durante 15 segundos. Tenha cuidado ao pegar na ferramenta de vácuo.

As bandas de sefarose depositam-se rapidamente. A captação de bandas deve ser efectuada imediatamente a seguir à agitação. Se tiver decorrido mais de 1 minuto desde que a placa foi agitada, agite de novo durante 1 minuto antes da captação das bandas.

Inspeccione a placa PCR para tirar completamente todas as amostras com a ferramenta de vácuo.

7. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de etanol 70% (depósito 1, imagem 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.
8. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 40 ml de solução de desnaturação (depósito 2, imagem 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 5 segundos.
9. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém 50 ml de tampão de lavagem (depósito 3, imagem 3). Enxagúe as sondas de filtro durante 10 segundos.
10. Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90° na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Imagem 4).



Imagem 4. Ilustração da ferramenta de vácuo levantada acima de 90° na vertical.

11. Enquanto a ferramenta de vácuo é mantida sobre a placa PyroMark Q24, desligue o interruptor de vácuo na ferramenta (Off).
12. Liberte as bandas na placa PyroMark Q24, mergulhando as sondas de filtro no iniciador de sequenciação diluído e movendo a ferramenta de vácuo cuidadosamente na horizontal.

Tenha cuidado para não danificar a placa PyroMark Q24 riscando-a com as sondas de filtro.

13. Transfira a ferramenta de vácuo para o depósito que contém água de grande pureza (depósito 4; imagem 3) e agite-a durante 10 segundos.
14. Lave as sondas de filtro, mergulhando as sondas em água de grande pureza (depósito 5; imagem 3) e aplicando vácuo. Enxagúe as sondas com 70 ml de água de grande pureza.
15. Levante a ferramenta de vácuo para cima e para trás, para além dos 90° na vertical, durante 5 segundos para drenar o líquido das sondas de filtro (Imagem 4).
16. Desligue o comutador de vácuo na ferramenta (Off) e coloque a ferramenta de vácuo na posição de parque (P).
17. Desligue a bomba de vácuo.

No final do dia de trabalho, deve-se eliminar os desperdícios líquidos e as soluções restantes e a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q24 deve ser verificada quanto a poeiras e derramamentos. Consultar "

Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos", página 56.

18. Aqueça a placa PyroMark Q24 com as amostras a 80 °C durante 2 minutos, utilizando o suporte de placa pré-aquecido PyroMark Q24.
19. Retire a placa PyroMark Q24 do suporte de placa quente e coloque-a num segundo suporte de placa PyroMark Q24 que foi mantido à temperatura ambiente (15 a 25 °C) para deixar as amostras arrefecer à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos.

20. Continue imediatamente com "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", na página 29.

Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24

Este protocolo descreve a preparação e o carregamento dos reagentes PyroMark Gold Q24 no cartucho PyroMark Q24, e o início e a conclusão da execução no PyroMark Q24. Para uma descrição mais detalhada sobre como configurar uma execução, consulte o *PyroMark Q24 User Manual*.

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- O relatório de informações de pré-execução, que se encontra no menu "Tools" (Ferramentas) na configuração da execução (consultar "Protocolo 1: Configuração da execução do sistema PyroMark Q24", na página 16), fornece informações sobre o volume de nucleótidos, enzimas e tampão de substrato necessário para uma execução específica.
- Utilize pontas descartáveis sem filtros hidrofóbicos no carregamento do cartucho para permitir o seu correcto funcionamento.

Procedimento

- 1. Dissolva cada enzima liofilizada e as misturas de substrato em 620 µl de água (H₂O, fornecida).**
- 2. Misture, agitando cuidadosamente o frasco.**
Não misture com agitação forte!
De forma a assegurar que a mistura está completamente dissolvida, deixe-a à temperatura ambiente (15 a 25 °C) durante 5 a 10 minutos. Certifique-se de que a solução não está turva antes de encher o cartucho PyroMark Q24. Se não utilizar de imediato os reagentes, coloque os frascos de reagente no gelo ou num frigorífico.
- 3. Deixe os reagentes e o cartucho PyroMark Q24 atingirem a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).**
- 4. Coloque o cartucho PyroMark Q24 com a etiqueta virada para si.**
- 5. Carregue o cartucho PyroMark Q24 com os volumes adequados de nucleótidos, enzimas e misturas de substrato de acordo com a Imagem 5.**
Certifique-se que não são transferidas bolhas de ar da pipeta para o cartucho.

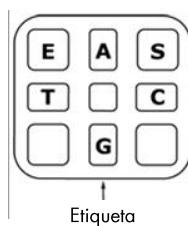


Imagem 5. Ilustração do cartucho PyroMark Q24 visto de cima. As anotações correspondem à etiqueta nos frascos de reagente. Adicione mistura de enzimas (**E**), mistura de substrato (**S**) e nucleótidos (**A, T, C, G**) de acordo com a informação do volume indicada no relatório de informações de pré-execução, que se encontra no menu "Tools" (Ferramentas) da configuração da execução.

6. Abra a porta do compartimento dos cartuchos e introduza o cartucho cheio de reagente, com a etiqueta virada para fora. Empurre totalmente o cartucho e, em seguida, empurre para baixo.
7. Certifique-se de que a linha está visível à frente do cartucho e feche a porta.
8. Abra a estrutura de suporte da placa e coloque a placa no bloco de aquecimento.
9. Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.
10. Introduza o dispositivo de armazenamento de dados USB (que contém um ficheiro de execução) na porta USB, na parte dianteira do equipamento.
Não remova o dispositivo de armazenamento de dados USB antes da conclusão da execução.
11. Seleccione "Run" (Execução) no menu principal (com os botões do ecrã ▲ e ▼) e prima "OK".
12. Seleccione o ficheiro de execução com os botões do ecrã ▲ e ▼.
Para ver os conteúdos de uma pasta, seleccione a pasta e prima em "Select" (Seleccionar). Para voltar à vista anterior, prima "Back" (Anterior).
13. Quando o ficheiro de execução estiver seleccionado, prima "Select" (Seleccionar) para iniciar a execução.
14. Quando a execução tiver terminado e o equipamento confirmar que a execução foi guardada no dispositivo de armazenamento de dados USB, prima "Close" (Fechar).
15. Remova o dispositivo de armazenamento de dados USB.
16. Abra a tampa do equipamento.
17. Abra a porta do compartimento dos cartuchos e retire o cartucho de reagente, levantando-o para cima e puxando-o para fora.
18. Feche a porta.
19. Abra a estrutura de suporte da placa e retire a placa do bloco de aquecimento.

20. Feche a estrutura de suporte da placa e a tampa do equipamento.
21. Elimine a placa e limpe o cartucho, conforme as instruções no folheto do produto fornecido com o cartucho.
22. Analise a execução de acordo com "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", na página 32.

Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24

Este protocolo descreve a análise de mutação de uma execução de GIST RapidScreen concluída, utilizando o software de PyroMark Q24.

Procedimento

1. Conecte o dispositivo de armazenamento de dados USB, que contém o ficheiro da execução processada, na porta USB do computador.
2. Copie o ficheiro de execução do dispositivo de armazenamento de dados USB para a localização pretendida no computador, usando o Windows Explorer.
3. Abra o ficheiro de execução no modo AQ do software PyroMark Q24, seleccionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (📁) no browser de atalhos.
4. Existem 2 métodos para analisar a execução. Se estiver a utilizar o GIST RapidScreen Plug-in Report, siga para o passo 5. Se estiver a utilizar a análise AQ como parte integrante do software PyroMark Q24, siga para o passo 6.

Nota: Recomendamos vivamente utilizar GIST RapidScreen Plug-in Report para documentação e interpretação de resultados. O GIST RapidScreen Plug-in Report pode ser obtido por e-mail a partir de pyro.plugin@qiagen.com. Este relatório garante que os respectivos valores LOD (Quadro 9) e as diferentes "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) são utilizados para detectar automaticamente todas as mutações.

Nota: Duas mutações complexas no exão 18 do gene *PDGFRA* (2526_2538>G e 2524_2526 GAC>TAT) não podem ser analisadas utilizando a análise AQ no software PyroMark Q24. Recomendamos a utilização do GIST RapidScreen Plug-in Report para a análise das mutações complexas do exão 18 do gene *PDGFRA*

5. **Utilização do GIST RapidScreen Plug-in Report:**
Para gerar um relatório, seleccione "AQ Add On Reports/GIST" a partir de "Reports" (Relatórios) no menu (ver Imagem 6).

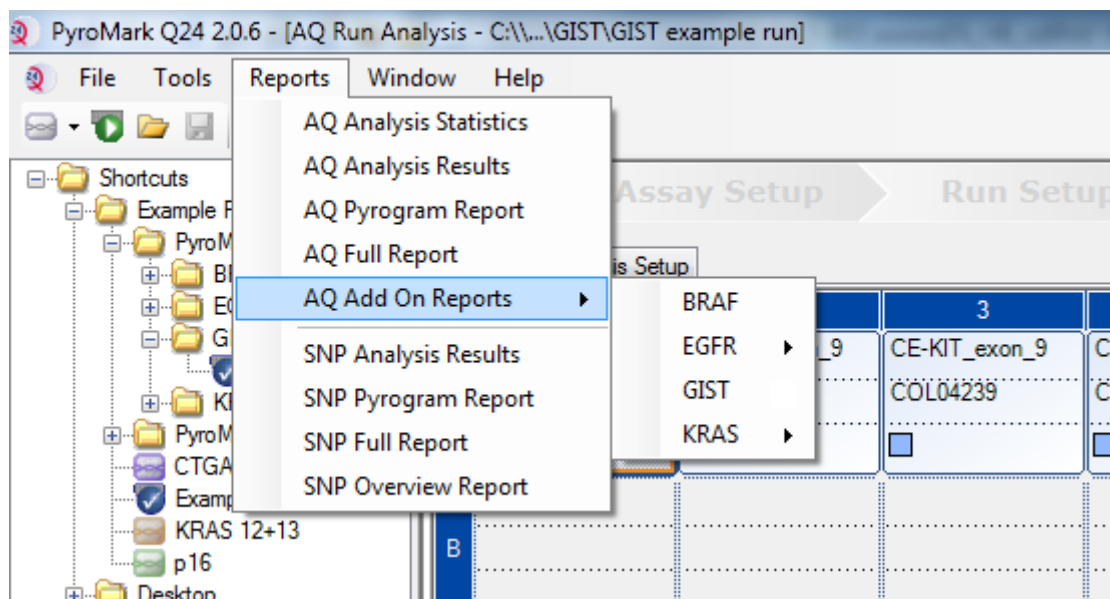


Imagem 6. Menu do GIST RapidScreen Plug-in Report.

Os poços serão analisados automaticamente em relação a todos os tipos de mutações, para as quais o LOD foi atribuído, no Quadro 9.

Os resultados serão apresentados num quadro de perspectiva geral (Imagem 7), seguidos de resultados detalhados que incluem pirogramas e a qualidade de análise.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Imagem 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.

6. Utilização da análise AQ:

Para analisar a execução e obter uma perspectiva geral dos resultados, clique num dos botões de Análise.



Analisar todos os poços.



Analisar o poço seleccionado.

Os resultados da análise (frequências dos alelos) e a avaliação de qualidade são apresentados por cima da posição variável, na curva de Pyrogram®. Para mais detalhes sobre como analisar uma execução, consulte o *PyroMark Q24 User Manual*.

Para criar um relatório, seleccione "AQ Full Report" (Relatório completo AQ) ou "AQ Analysis Results" (Resultados de análise AQ) no menu "Reports" (Relatórios).

Nota: Para resultados fiáveis, recomenda-se alturas de picos individuais acima de 30 RLU. Defina 30 RLU como "required peak height for passed quality" (altura de pico necessária para qualidade aprovada) na configuração do ensaio (consulte "Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro" e o *PyroMark Q24 User Manual*).

Nota: O relatório "AQ Analysis Results" (Resultados da análise AQ) deverá ser utilizado para documentação e interpretação da quantificação dos alelos. Os números apresentados no pirograma são arredondados e não indicam a quantificação exacta.

Nota: O pirograma deverá ser sempre comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Os picos medidos deverão corresponder às alturas das barras do histograma.

Nova análise de amostras sem mutações detectadas com a "Sequence to analyze" (Sequência a analisar) padrão ou com avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada)

A "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) padrão, conforme definida na configuração de análise, aborda a duplicação do par de bases 6 no exão 9 do gene *KIT* e a mutação de ponto único mais frequente do códon 842 (GAC>GTC) do exão 18 do gene *PDGFRA* (consulte o anexo A, página 52). Se uma amostra contiver uma mutação menos frequente no exão 18 do gene *PDGFRA*, a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) pode ser alterada para analisar o estado mutacional desta mutação, como descrito no anexo A.

Duas mutações complexas no exão 18 do gene *PDGFRA* (2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT) não podem ser analisadas utilizando a análise AQ no software PyroMark Q24. Recomendamos a utilização do GIST RapidScreen

Plug-in Report para a análise das mutações complexas do exão 18 do gene *PDGFRA*

Recomenda-se vivamente a nova análise de todas as amostras sem mutação detectada com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) padrão, bem como de amostras que tenham recebido a avaliação de qualidade "Check" (verificada) ou "Failed" (Falhada). As avaliações de qualidade "Check" (Verificada) e "Failed" (Falhada) podem indicar uma mutação rara que não foi endereçada pela "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) padrão, resultando em picos de referência inesperados.

Para reanalisar e detectar as mutações menos frequentes, aceda a "Analysis Setup" (Configuração de análise) e altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) para as variantes descritas no Anexo A ou variantes de outras mutações raras ou inesperadas. Clique em "Apply" (Aplicar) e, em seguida, clique em "To All" (Para todos), quando aparecer a janela "Apply Analysis Setup" (Aplicar a configuração de análise).

As frequências actualizadas das mutações no gene humano *KIT/PDGFRA* são fornecidas via online pelo Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: Depois de alterar a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar), certifique-se de que o limiar da altura dos picos individuais está definido para 30 RLU.

Nota: Mutações adicionais raras ou não esperadas poderão estar presentes na região sequenciada e poderão ser analisadas utilizando uma "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) alternativa, tendo em conta as mutações não esperadas.

Nota: Caso os picos medidos não correspondam às alturas das barras do histograma e não possam ser explicados por mutações raras ou inesperadas, o resultado não é uma base para uma decisão do estado de mutação. Recomenda-se uma nova execução da amostra.

Interpretação de resultados

Interpretação de resultados da análise e detecção de mutações de baixo nível

Recomenda-se vivamente a inclusão de ADN de controlo não metilado em todas as execuções, para efeitos de comparação e como controlo de níveis de fundo. A frequência medida da amostra de controlo deverá ser igual ou menor que o limite do branco (LOB). Os valores do LOB (limite do branco) e do LOD (limite de detecção) indicados nos manuais de instruções podem ser utilizados quando determinar a presença de uma mutação. Estes valores foram obtidos utilizando misturas de plasmídeos que exibem a sequência *wild type* ou a relevante sequência mutada.

Depois da análise utilizando o software PyroMark Q24 ou os Plug-in Reports, são possíveis 3 resultados.

- Frequência de mutação < LOD: Mutação não detectada
- Frequência de mutação > LOD + 3 unidades de %: Mutação
- Frequência de mutação \geq LOD e \leq LOD + 3 unidades de %: Nível de mutação potencialmente baixo

Nota: Se utilizar o GIST RapidScreen Plug-in Report (ver passo 5 de "Protocolo 6: Análise de uma execução PyroMark Q24", na página 32) e isto ocorrer, é emitida uma advertência.

O intervalo de LOD a LOD + 3 unidades de % permite a detecção sensível de mutações de baixo nível quando em óptimas condições. Uma frequência medida acima do LOB na amostra de controlo não metilada indica um nível de fundo maior que o habitual na respectiva execução, que poderá ter impacto na quantificação dos alelos, especialmente para os níveis de mutação baixos. Portanto os resultados com a indicação "Potential low level mutation" (Nível de mutação potencialmente baixo) devem ser avaliados cuidadosamente.

As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo só deverão ser consideradas positivas quanto à mutação, se confirmadas por nova execução em duplicado, juntamente com o ADN de controlo não metilado. O resultado de ambos os duplicados deverá indicar a mesma mutação com valores \geq LOD, e a amostra de controlo deverá ser indicada como "No mutation detected" (Nenhuma mutação detectada). Caso contrário a amostra deverá ser considerada como "No Mutation Detected" (Nenhuma mutação detectada).

O fundo aumentado de uma mutação pode ser detectado comparando os valores de LOB indicados no manual de instruções com os valores obtidos com o ADN de controlo não metilado. As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo podem ser classificadas como "Mutation not detected" (Mutação não detectada) sem necessidade de repetição se a frequência medida do ADN de controlo não metilado for superior ao valor de LOB indicado no manual de instruções para a mutação relevante. Por conseguinte são possíveis 3 cenários diferentes com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo.

1. Frequência de medição com ADN de controlo não metilado $>$ LOB para esta mutação: A amostra pode ser classificada como "Mutation not detected" (Mutação não detectada) sem necessidade de repetição.
2. Resultado não reproduzido em duplicado com o mesmo resultado: Classificar amostra como "Mutation not detected" (Mutação não detectada).
3. Reproduzida em duplicado com o mesmo resultado e amostra *wild type* $<$ LOB para a mutação relevante: Mutação detectada.

Nota: O pirograma deverá ser sempre comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Os picos medidos deverão corresponder às alturas das barras do histograma. Os pirogramas deverão ser examinados em relação ao aparecimento de picos inesperados. Se os picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras ou não esperadas, recomenda-se que a amostra seja novamente executada. Um resultado falhado não é uma base para uma decisão de estado de mutação. Para uma mutação válida, uma alteração na altura de pico está sempre relacionada a uma alteração correspondente na altura de outro pico. Uma alteração na altura de um só pico não deverá ser considerada como uma indicação de uma mutação.

Nota: Recomenda-se a utilização do GIST RapidScreen Plug-in Report para a interpretação de resultados. Para um exame mais minucioso das amostras com um nível de mutação indicado como potencialmente baixo, recomenda-se que a amostra seja também analisada manualmente no software da aplicação (por ex., para comparação com a frequência de mutação da amostra de controlo).

Nota: Uma decisão de tratamento para doentes de cancro não se pode basear unicamente no estado de mutação do exão 9 do gene *KIT* e do exão 18 do gene *PDGFRA*.

Quadro 9. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de aminoácido	LoB (unidades de %)	LoD (unidades de %)	ID COSMIC* (v58)
KIT exão 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
PDGFRA exão 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ou [‡]	D842_H845del ou [‡]	2,2	5,2	737 ou [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] As mutações 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT, e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 resultam na mesma alteração de aminoácido, respectivamente.

[‡] As mutações 2524_2535del12 e 2526_2537del12 resultam na mesma alteração de ácido nucleico.

[§] A mutação 2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT não pode ser analisada no modo AQ do software PyroMark Q24.

Resultados representativos

Os resultados representativos do pirograma estão apresentados nas Imagens 8 a 11.

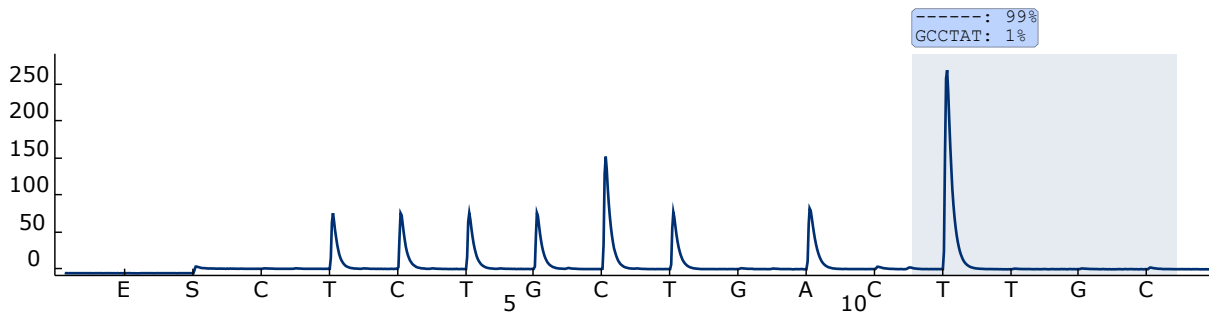


Imagem 8. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo *wild type* no exão 9 do gene *KIT* com a "Sequence to Analyze" (Sequência a Analisar) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* a abordar a duplicação do par de bases 6 após o códon 503.

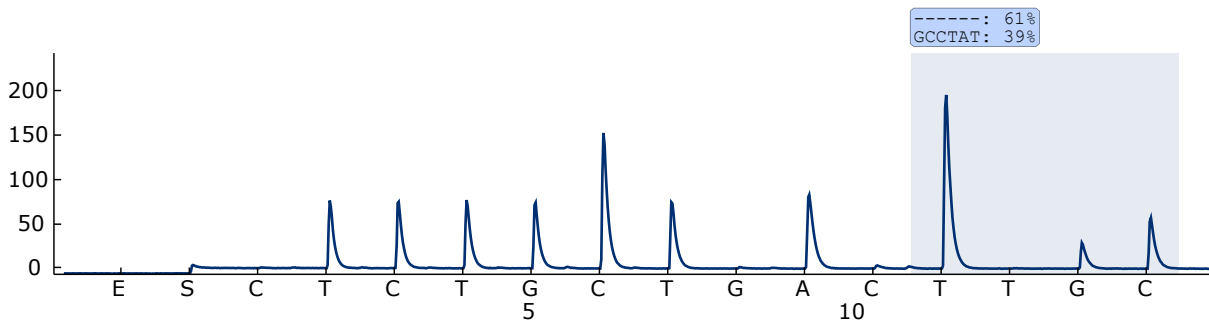


Imagem 9. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com uma duplicação *GCCTAT* após o códon 503 no exão 9 do gene *KIT* com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.

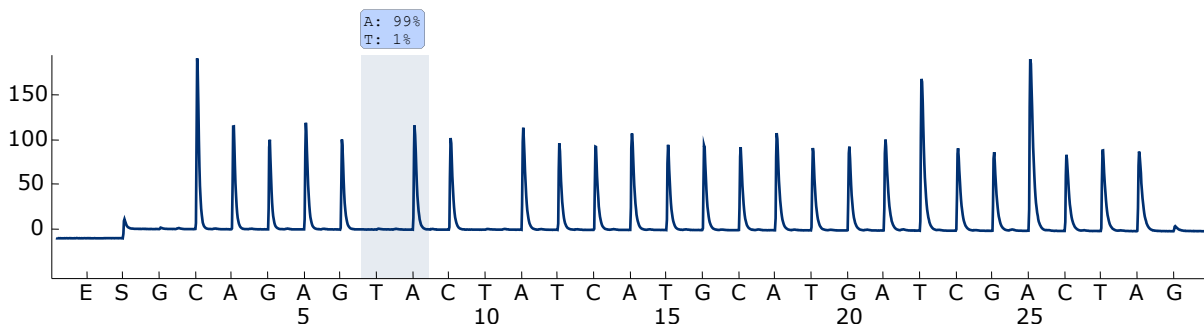


Imagem 10. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com um genótipo *wild type* no exão 18 do gene *PDGFRA* com a "Sequence to Analyze" (Sequência a Analisar) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACCTAT* a abordar mutação *GAC>GTC* no códon 842 (nucleótido 2525).

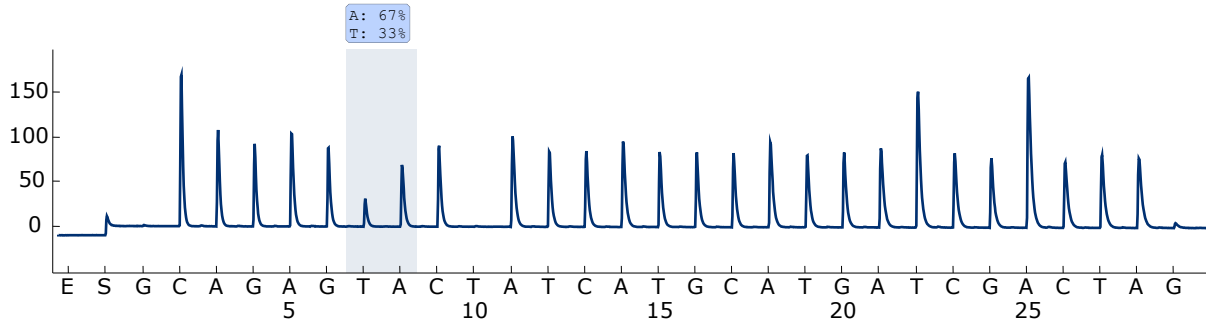


Imagem 11. Curva de pirograma obtida após a análise de uma amostra com uma mutação GAC>GTC no códon 842 (nucleótido 2525) do exão 18 o gene *PDGFRA*, com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) CCAGAGWCATCATGCATGATTGAACTAT.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Consulte o *PyroMark Q24 User Manual* (Manual de Utilizador do PyroMark Q24) para resolução de problemas gerais do equipamento.

Comentários e sugestões

Sinais no controlo sem modelo (controlo negativo)

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Interferência entre poços | ○ sinal de um poço é detectado num poço vizinho. Evite colocar as amostras com intensidades de sinal altas junto a poços "no template control" (sem controlo de modelos). |
| b) Contaminação de PCR | Utilize pontas de pipeta esterilizadas com filtros. Armazene e extraia os materiais, como amostras, controlos e amplicons, separadamente dos reagentes de PCR. |

Comentários e sugestões

Sequência pobre ou inesperada

ADN genómico de baixa qualidade

ADN genómico de baixa qualidade pode causar a falha da PCR. Analise as amostras de PCR utilizando uma técnica de electroforese (por exemplo, o sistema QIAxcel® ou a electroforese em gel de agarose).

Resultado "Check" (verificado) ou "failed" (falhado)

a) Altura de pico baixa

Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em picos baixos.

É importante que as amostras sejam completamente levadas pela ferramenta de vácuo. Tome precauções para que a ferramenta de vácuo seja baixada lentamente nas amostras e que a geometria da placa da PCR ou tiras utilizadas para a imobilização permita que as amostras sejam completamente levadas.

Efectue regularmente o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no *PyroMark Q24 Manual* (Manual do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando for indicado.

Em caso de um aviso "Check", compare cuidadosamente o pirograma ao histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Se os picos medidos corresponderem às alturas das barras do histograma, o resultado é válido. Caso contrário, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

b) Mutação não definida na "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar)

Ajuste a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) na configuração do ensaio (consultar "Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", na página 52) e reanalise a execução.

Comentários e sugestões

- c) Mutações raras inesperadas
Uma avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto poderá indicar uma mutação inesperada, que não é analisada pela "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) fornecida. Estas amostras devem ser analisadas com as "Sequences to Analyze" (Sequências a analisar) alternativas, tendo em conta mutações inesperadas.
- d) Aviso de desvio da altura de pico alta durante uma distribuição
O pirograma deverá ser cuidadosamente comparado com o histograma, que pode ser visualizado clicando com o botão direito do rato na janela do pirograma. Em caso dos picos medidos não corresponderem às alturas das barras do histograma e não puderem ser explicados por mutações raras, recomenda-se que a amostra seja novamente executada.

Plano de fundo alto

- a) Armazenamento incorrecto de nucleótidos
Armazene os nucleótidos entre 2 e 8 °C. O armazenamento entre -15 e -30 °C pode provocar um aumento no plano de fundo.
- b) Pouco tempo de arrefecimento das amostras antes da análise de pirosequenciação
Mantenha as amostras num suporte de placa PyroMark Q24 à temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Não reduza o tempo de arrefecimento.
- c) Contaminação do cartucho
Limpe cuidadosamente o cartucho conforme descrito no folheto do produto. Guarde o cartucho protegido da luz e da poeira.

Sem sinais no controlo positivo (ADN de controlo não metilado)

- a) Enzima insuficiente ou mistura de substrato para todos os poços
Certifique-se de que enche o cartucho PyroMark Q24 de acordo com as "Pre Run Information" (Informações de pré-execução) no menu "Tools" (Ferramentas).

Comentários e sugestões

- | | |
|--|--|
| b) Reagentes armazenados ou diluídos incorrectamente | Prepare os reagentes de acordo com as instruções no "Protocolo 5: Execução do sistema PyroMark Q24", página 29. |
| c) Falha da PCR ou da preparação da amostra | Eventuais erros de manuseamento na configuração da PCR, na programação do ciclador de PCR ou na preparação de amostras antes da piro-sequenciação podem resultar em falta de sinais. Efectue o teste de funcionamento das sondas de filtro, conforme descrito no <i>PyroMark Q24 Manual</i> (Manual do PyroMark Q24) e substitua as sondas de filtro quando indicado. Repita a PCR e a análise de piro-sequenciação. |

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade Total certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro são testados quanto às especificações predeterminadas, a fim de garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outras descobertas clínicas ou laboratoriais.

É necessário o cumprimento estrito do manual de utilizador para a obtenção de resultados PCR otimizados. Devem ser observados os prazos de validade impressos na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilizar componentes fora do prazo de validade.

Características de desempenho

Limite do branco e limite de detecção

O limite em branco (LOB) e o limite de detecção (LOD) foram determinados para um número de mutações, usando misturas de plasmídeos (quadro 10). O LOB e o LOD foram determinados de acordo com as recomendações da directriz EP17-A "Protocolo para a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação; directriz aprovada" do Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI). Os erros α e β (falso positivo e falso negativo, respectivamente) foram definidos em 5%. Os LOD de algumas destruições raras no exão 18 do gene *PDGFRA* foram determinados adicionando 3 desvios padrão de medições em branco ao valor LOB. Os valores LOD foram definidos pelo menos 3 unidades de % acima do valor LOB.

Os valores de LOB representam a frequência medida obtida com uma amostra de tipo selvagem (*wild type*). Os valores de LOD representam o sinal mais baixo (frequência medida) que pode ser observado como positivo para a respectiva mutação.

Quadro 10. LOB e LOD determinados para mutações específicas

Substituição de ácido nucleico	Substituição de aminoácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (v58)
<i>KIT</i> exão 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
<i>PDGFRA</i> exão 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ou [‡]	D842_H845del ou [‡]	2,2	5,2	737 ou [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

[†] As mutações 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT, e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 resultam na mesma alteração de aminoácido, respectivamente.

[‡] As mutações 2524_2535del12 e 2526_2537del12 resultam na mesma alteração de ácido nucleico.

§ Os LOD destas destruições no exão 18 do gene *PDGFRA* foram determinados adicionando 3 desvios padrão de medições em branco ao valor LOB.

¶ A mutação 2526_2538>G não pode ser analisada no modo AQ do software PyroMark Q24.

Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando misturas de plasmídeos que exibiam a sequência wild type ou mutante para a duplicação 1509_1510insGCCTAT no exão 9 do gene *KIT* e para a mutação 2525A>T no exão 18 do gene *PDGFRA*. Os plasmídeos foram misturados em proporções de modo a serem obtidos 4 níveis de mutação (5, 10, 30 e 50%). Cada mistura foi analisada com 3 lotes diferentes do kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro, em 3 execuções de piro-sequenciação, com 3 exemplares cada.

Os resultados ($n = 9$ para cada nível de mutação) foram analisados de acordo com a directriz EP6-A do CLSI "Avaliação da linearidade dos procedimentos de medições quantitativas: uma abordagem estatística; directriz aprovada" utilizando o software Analyse-it® v2.21 e estão indicados nas Imagens 12 e 13.

Os resultados foram lineares dentro de uma não linearidade permitida de 5 unidades de % no intervalo testado de 5 a 50% de nível de mutação.

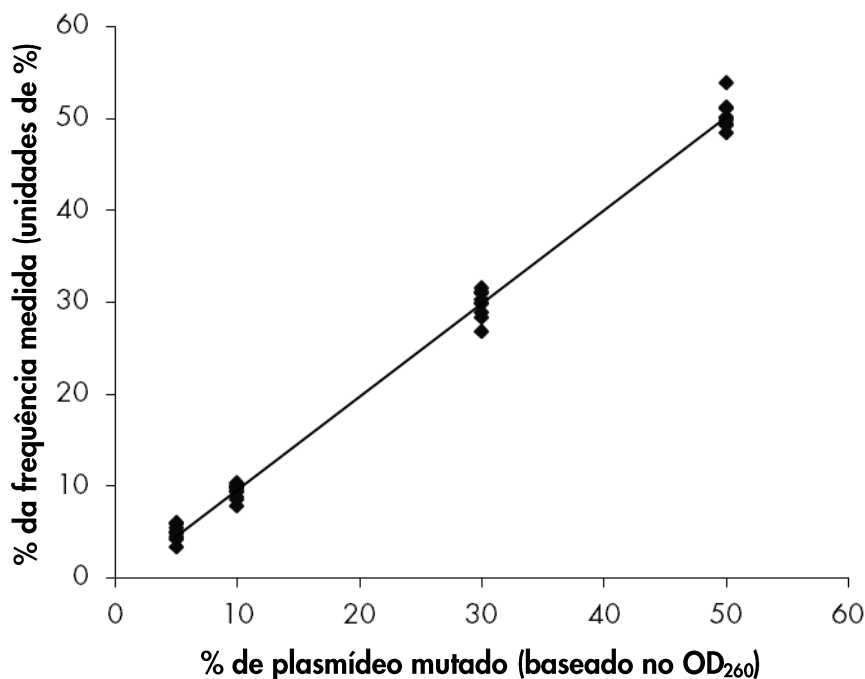


Imagem 12. Linearidade da duplicação 1509_1510insGCCTAT no exão 9 do gene *KIT*.

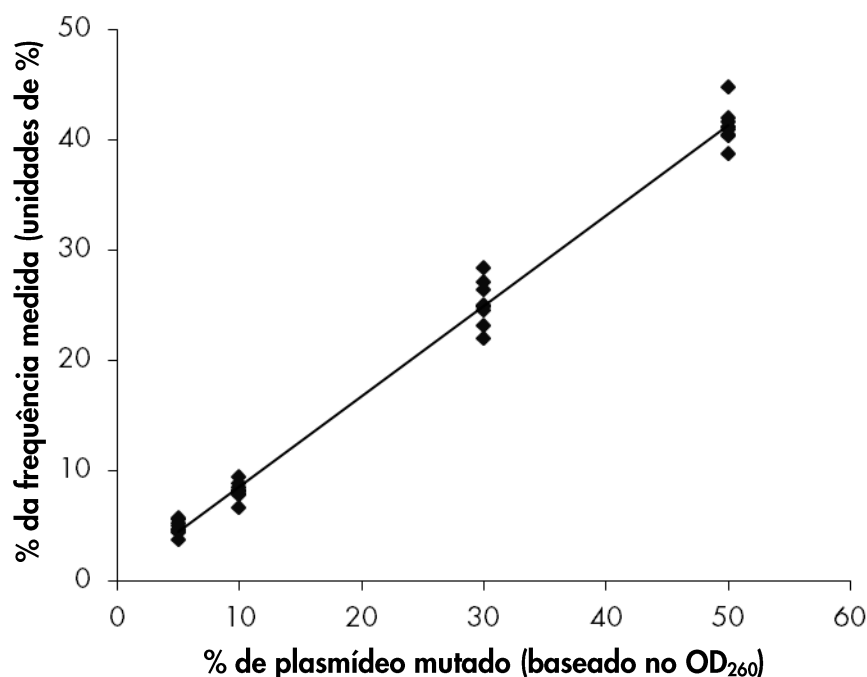


Imagem 13. Linearidade da mutação 2525A>T no exão 18 do gene *PDGFRA*.

Precisão

Os dados da precisão permitem a determinação da variação total dos ensaios e foram obtidos a 3 diferentes níveis por análise das misturas de plasmídeos mencionadas acima, com 3 exemplares cada.

A repetibilidade (variação intra-ensaio e inter-lotes) foi calculada com base nos dados para a determinação da linearidade (3 execuções no mesmo dia, utilizando variados lotes do kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro). A precisão intermédia (variação intra-laboratorial) foi determinada em 3 execuções, em um laboratório, em 3 dias diferentes, com vários operadores, equipamentos PyroMark Q24 e lotes do kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. A reprodutibilidade (variação inter-laboratorial) foi calculada com 2 execuções, cada uma em um laboratório interno e um laboratório externo, e utilizando variados lotes do kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Os cálculos de precisão são expressos como desvio padrão das frequências de mutação medidas em unidades de % (Quadro 11). A repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade da duplicação 1509_1510insGCCTAT no exão 9 do gene *KIT* foram de, respectivamente, 0,8 a 1,6, 0,5 a 1,5 e 0,7 a 1,9 unidades de %, no intervalo medido de 5 a 50% de nível de mutação. A repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade da mutação 2525A>T no exão 18 do gene *PDGFRA* foram de, respectivamente, 0,6 a 1,9,

0,6 a 3,7 e 0,5 a 2,4 unidades de %, no intervalo medido de 5 a 50% de nível de mutação.

Quadro 11. Precisão da duplicação 1509_1510insGCCTAT no exão 9 do gene *KIT**

% de plasmídeo mutado [†]	Repetibilidade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

* Todos os valores são indicados em unidades de %. DP: desvio padrão (n=9).

[†] Baseado em medição do OD₂₆₀.

Quadro 12. Precisão da mutação 2525A>T no exão 18 do gene *PDGFRA*‡

% de plasmídeo mutado [§]	Repetibilidade		Precisão intermédia		Reprodutibilidade	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

‡ Todos os valores são indicados em unidades de %. DP: desvio padrão (n=9).

§ Baseado em medição do OD₂₆₀.

Avaliação de diagnóstico

O kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro foi avaliado em comparação com a sequenciação Sanger. Foi extraído o ADN de 100 amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina (FFPE) de amostras de tumor GIST e analisado quanto a mutações no exão 9 do gene *KIT* e no exão 18 do gene *PDGFRA*.

O ADN foi isolado utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Foram realizadas análises com o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro no PyroMark Q24. Foi realizada sequência Sanger no 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems®.

De 100 amostras analisadas, foi possível determinar o estado mutacional de todo o exão 9 do gene *KIT* (Imagem 13) e do exão 18 do gene *PDGFRA* (Imagem 14) com ambos os métodos.

Quadro 13. Resultados das amostras de tumor GIST analisadas para o exão 9 do gene *KIT*

KIT exão 9		Sequenciação Sanger		
		Nenhuma mutação detectada	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Total
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nenhuma mutação detectada	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Total	92	8	100

Quadro 14. Resultados das amostras de tumor GIST analisadas para o exão 18 do gene *PDGFRA*

PDGFRA exão 18		Sequenciação Sanger				Total
		tipo selv.	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nenhuma mutação detectada	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Total	93	2	3	2	100

Nota: Em todas as execuções utilizadas para a determinação das características de desempenho, o sinal era superior a 30 RLU, conforme obtidos rotineiramente de 10 ng de ADN isolado de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPE). Os dados de piro-sequenciação foram analisados utilizando o GIST RapidScreen Plug-in Report.

Bibliografia

A QIAGEN mantém uma vasta base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem-lhe localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa da bibliografia, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Referências citadas

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> testes



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Ref.^o



Número de lote



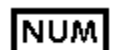
Número do material



Componentes



Conteúdo



Número



Número do item de comércio mundial



Limitação de temperatura



Fabricante



Consultar instruções de utilização



Atenção

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Anexo A: Preparação de ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

No caso de o GIST RapidScreen Plugin Report estar instalado, estão disponíveis configurações de ensaio predefinidas para o exão 9 do gene *KIT* e o exão 18 do gene *PDGFRA* no browser de atalhos do software PyroMark Q24, no caminho "Example Files/PyroMark Setups/GIST". Não é necessário efectuar os passos seguintes. O GIST RapidScreen Plug-in Report pode ser obtido através de pyro.plugin@qiagen.com.

Recomenda-se vivamente a utilização do GIST RapidScreen Plug-in Report em vez da análise manual. Não podem ser adicionadas manualmente mutações complexas do exão 18 do gene *PDGFRA* a uma "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) e têm de ser analisadas usando o GIST RapidScreen Plug-in Report. Após a instalação do plug-in ou sempre que um novo software é instalado ou actualizado no computador do escritório, deve-se verificar o funcionamento correcto do plug-in, conforme descrito no GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide (Guia rápido do GIST RapidScreen Plug-In).

Se o GIST RapidScreen Plug-in Report não tiver sido instalado, o ficheiro de ensaio tem de ser configurado manualmente antes da primeira execução dos ensaios *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Configure o ensaio do exão 9 do gene *KIT* e do exão 18 do gene *PDGFRA* através do software PyroMark Q24, como descrito a seguir.

Procedimento

KIT exão 9

A1. Clique em  na barra de ferramentas e seleccione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).

A2. Introduza manualmente o "Dispensation Order" (Pedido de distribuição) seguinte:
CTCTGCTGACTTGC

A3. Digite a sequência seguinte em "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA

A duplicação do par de bases 6 GCCTAT após o códão 503 no exão 9 do gene *KIT* será detectada usando esta "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).

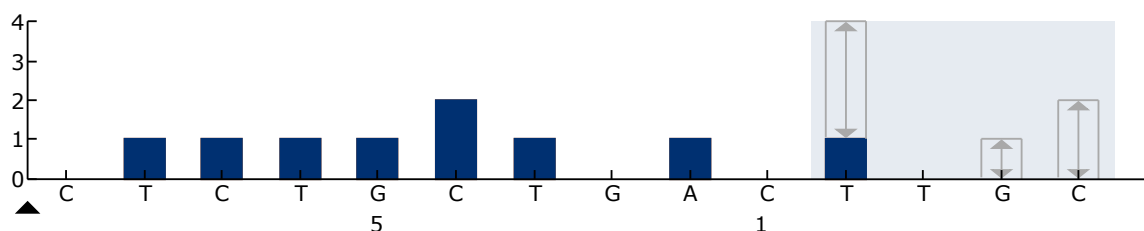


Imagem 14. Histograma do exão 9 do gene *KIT* com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* que aborda a duplicação do par de bases 6 após o códon 503.

- A4.** Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.
- A5.** Clique em na barra de ferramentas e guarde o ensaio como "KIT exon 9".

PDGFRA exão 18

- A1.** Clique em na barra de ferramentas e selecione "New AQ Assay" (Novo ensaio AQ).
- A2.** Adicione manualmente o "Dispensation Order" (Pedido de distribuição) seguinte:
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3.** Digite a sequência seguinte em "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).
CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT

A mutação GAC>GTC mais frequente no códon 842 (nucleótido 2525) do exão 18 do gene PDGFRA será detectado usando esta "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).

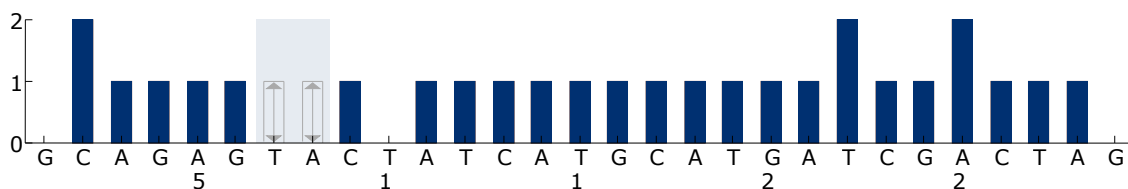



Imagem 15. Histograma do exão 18 do gene *PDGFRA* com a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* que aborda a mutação GAC>GTC no códon 842 (nucleótido 2525).

A "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) pode ser alterada após a execução para analisar adicionalmente em busca de mutações no nucleótido 2524 (códon 842) assim como 9 destruições e mutações complexas dentro da região do códon 842 ao 847.

Para verificar se as seguintes mutações estão presentes, altere a "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) de acordo com o Quadro 15.

Nota: O aviso "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (Quantificação pode ser incerta: a posição variável requer mais do que 5 distribuições) durante a configuração do ensaio pode ser ignorada.

Nota: Certifique-se de que o limiar da altura de picos singulares está definido para 30 RLU.

- A4. Clique no separador "Analysis Parameters" (Parâmetros de análise) e aumente "Peak Height Threshold Required peak height for Passed quality:" (Limiar de altura de pico – altura de pico necessária para qualidade aprovada:) para 30.**
- A5. Clique em  na barra de ferramentas e guarde o ensaio como "PDGFRA exon 18".**

Quadro 15. Mutações comuns detectadas pelo kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro usando diferentes "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar)

Alteração de ácido nucleico	Alteração de aminoácido	"Sequence to Analyze" (Sequência a analisar)
KIT exão 9		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
PDGFRA exão 18		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 ou [‡] 2526_2537del12	D842_H845del ou [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	– [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	– [§]


* "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar) padrão.

[†] As mutações 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT, e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 resultam na mesma substituição de aminoácido, respectivamente.

[‡] As mutações 2524_2535del12 e 2526_2537del12 resultam na mesma substituição de ácido nucleico e são analisadas pelo mesma "Sequence to Analyze" (Sequência a analisar).

[§] A mutação 2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT não pode ser analisada no modo AQ do software PyroMark Q24.

Anexo B: Esvaziar o recipiente de desperdícios e os depósitos

AVISO 	Químicos perigosos <p>A solução de desnaturação utilizada com a estação de trabalho de vácuo contém hidróxido de sódio, que irrita os olhos e a pele.</p> <p>Usar sempre óculos de segurança, luvas e uma bata de laboratório adequada.</p> <p>A entidade responsável (por ex., gestor de laboratório) tem de tomar as precauções necessárias para assegurar que o local de trabalho circundante está em segurança e que os operadores do equipamento não estão expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas e biológicas), como definido nas fichas de material de segurança (MSDS's) aplicáveis ou nos documentos OSHA*, ACGIH† ou COSHH‡.</p> <p>A ventilação de gases e eliminação de desperdícios tem de estar em conformidade com todos os regulamentos e legislações nacionais, distritais e locais em matéria de saúde e de segurança.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Estados Unidos da América).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Estados Unidos da América).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Reino Unido).

Certifique-se de que observa os regulamentos ambientais federais, distritais e locais relativamente à eliminação de desperdícios laboratoriais.

Aspecto importante antes do início do procedimento

- Este protocolo requer água de grande pureza (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, ou equivalente).

Procedimento

- B1. Assegure-se de que não há vácuo aplicado na ferramenta de vácuo. Certifique-se de que o vácuo está fechado (Off) e que a bomba de vácuo está desligada.**
- B2. Elimine quaisquer soluções que tenham ficado nos depósitos.**
- B3. Lave os depósitos com água de grande pureza ou substitua-os, se necessário.**

B4. Esvazie o recipiente de desperdícios.

A tampa pode ser retirada sem retirar a tubagem.

B5. Se a estação de trabalho de vácuo tiver de ser limpa (por exemplo, devido a poeiras ou derrames), siga as instruções descritas no *Manual de Utilizador do PyroMark Q24*.

Informações para encomendar

Produto	Índice	Ref.º
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Para 24 reacções nos sistemas PyroMark Q24: Iniciadores de Seq, iniciadores de PCR, ADN de controlo não metilado, mistura principal de PCR PyroMark, concentrado CoralLoad, tampão de ligação PyroMark, tampão de "annealing" PyroMark, solução de desnaturação PyroMark, tampão de lavagem PyroMark, mistura de enzimas, mistura de substrato, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP e H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001513
PyroMark Q24	Plataforma de detecção baseada na sequência para a piro-sequenciação de 24 amostras em simultâneo	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo (220 V) para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Estação de trabalho de vácuo para preparar 24 amostras em simultâneo, desde o produto de PCR até ao modelo de cadeia simples	9001518

* Apenas no Reino Unido.

† Restantes países.

Produto	Índice	Ref.º
PyroMark Q24 MDx Software	Software de aplicação	9019063
PyroMark Q24 Software	Software de análise	9019062
Acessórios		
PyroMark Q24 Plate (100)	Placa de reacção de sequenciação de 24 poços	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartuchos para distribuir nucleótidos e reagentes	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondas de filtro reutilizáveis para a estação de trabalho de vácuo PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Para a verificação da instalação do sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Para a confirmação do desempenho do sistema	979304
Produtos relacionados		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas, Proteinase K, soluções tampão, tubos de recolha (2 ml) QIAamp MinElute®	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Para 48 preparações: Cartuchos de reagentes (tecido), pontas com filtros descartáveis, suportes de pontas descartáveis, tubos de amostra (2 ml), tubos de eluição (1,5 ml), tampão G2, Proteinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Para 50 preparações: Colunas de rotação, soluções tampão, reagentes, tubos, conectores de vácuo mini do QIAamp	61104

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual de instruções do kit QIAGEN ou o manual do utilizador. Os manuais de instruções do kit QIAGEN e os manuais do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Esta página foi deixada intencionalmente em branco

Marcas registadas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4fititude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Contrato de Licença Limitada para o kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizador QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos não infringem os direitos de terceiros.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013–2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ▪ techservice-au@qiagen.com

Austria ▪ techservice-at@qiagen.com

Belgium ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ▪ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ▪ techservice-ca@qiagen.com

China ▪ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ▪ techservice-nordic@qiagen.com

France ▪ techservice-fr@qiagen.com

Germany ▪ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ▪ techservice-hk@qiagen.com

India ▪ techservice-india@qiagen.com

Ireland ▪ techservice-uk@qiagen.com

Italy ▪ techservice-it@qiagen.com

Japan ▪ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ▪ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ▪ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ▪ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ▪ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ▪ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ▪ techservice-ch@qiagen.com

UK ▪ techservice-uk@qiagen.com

USA ▪ techservice-us@qiagen.com

